



胞浆/胞核蛋白提取试剂

货号: R1190

存储条件: -20℃, 12 个月有效, 冰袋运输。

产品组分

组分	50T	100T
胞浆蛋白提取试剂	15ml	30ml
胞核蛋白提取试剂	5ml	10ml
PMSF (100 mM)	0.2ml	0.4ml

产品说明

胞浆与胞核蛋白的提取是 EMSA、IP、footprinting、酶活测定等实验能否成功的关键前提, 但胞浆、胞核蛋白的成功提取并不容易。其难点在于, 对于 EMSA、IP、footprinting、酶活测定等实验来说, 提取的蛋白应保持相对完整的立体构象和功能活性, 而一般蛋白提取使用的细胞裂解剂和表面活性剂常常会破坏蛋白的构象和活性。本试剂盒配置了温和的细胞膜与核膜裂解剂, 不会破坏蛋白的立体构象, 同时还配置了能够有效维持蛋白构象的抗变性剂和还原剂, 有效解决了一般蛋白提取过程中蛋白质构象破坏和活性缺失的问题, 特别适合于 EMSA、IP、footprinting、酶活测定、基因表达功能检测等对蛋白质构象和功能要求较高的研究。

试剂准备

1. 室温融解试剂盒中的三种试剂, 融解后立即放置在冰上, 混匀。
2. 胞质蛋白提取液: 取适量的胞浆蛋白提取试剂, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM。
3. 胞核蛋白提取液: 取适量的胞核蛋白提取试剂, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mM。

操作步骤

一、细胞样品 (贴壁细胞/悬浮细胞)

1、贴壁细胞前处理:

- 1.1 取出细胞培养板, 吸去培养液, 用 2-8 °C 预冷的 PBS (0.01M, pH7.4) 或生理盐水清洗细胞两次, 清洗完后彻底吸弃 PBS 或生理盐水。
- 1.2 用刮板刮下细胞, 或用 0.02% EDTA 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧, 并用移液器吹打下细胞。离心收集细胞, 吸弃上清, 保留细胞沉淀。尽量避免用胰酶消化细胞, 以免胰酶降解需提取的目的蛋白。

2、悬浮细胞前处理:

- 2.1 将悬浮细胞转移至洁净离心管内, 4 °C, 800 g 离心 5 min, 使细胞沉淀在离心管底, 彻底吸弃上清液, 加入细胞沉淀 5 倍量的预冷 PBS 或生理盐水, 温和手振 30s, 使细胞充分散开。
- 2.2 在 4 °C 下, 800 g 离心 5 min, 吸弃上清, 保留细胞沉淀。

3、细胞质蛋白提取: 向细胞沉淀中加入 5 倍细胞体积预冷胞质蛋白提取液, 强烈涡旋震荡 5s, 冰浴孵育 15 min, 期间每隔 5 min 用移液器吹打 10 次; 随后 13000 g、4 °C 离心 10 min, 上清即为细胞质蛋白, 将其转移到干净的 EP 管中, 所余沉淀即为细胞核。

4、细胞核裂解: 向细胞核沉淀中加入 2 倍细胞体积 (注意为 2 倍细胞体积, 非细胞核沉淀体积) 的预冷胞核蛋白提取液, 强烈涡旋震荡 15s 至沉淀完全分散, 冰浴孵育 30 min, 期间每 10 min 用移液器吹打 10 次; 16000 g、4 °C 离心 20 min, 上清即为细胞核蛋白, 转移到干净的 EP 管中保存。

二、组织样品

- 1、取新鲜组织, 用预冷的 PBS 或生理盐水反复清洗至无明显血迹, 将组织剪成 2-3 mm³ 的小块, 转移至玻璃匀浆器中。
- 2、按每 50mg 组织加入 200 μL 预冷的胞质蛋白提取液, 在冰浴条件下用玻璃匀浆器充分匀浆, 直至无肉眼可见的组织团块





3、匀浆后把匀浆液转移到干净的 EP 管内，冰浴放置 15 min。

4、4 °C，13000g 离心 5 min。把上清转移至一预冷的 EP 管中，即为提取得到的胞浆蛋白，所余沉淀即为细胞核沉淀。（注：吸上清时千万不要触及沉淀）

5、细胞核裂解：向细胞核沉淀中加入 2 倍组织体积的预冷胞核蛋白提取液，强烈涡旋震荡 15s 至沉淀完全分散，冰浴孵育 30 min，期间每 10 min 用移液器吹打 10 次；16000 g、4 °C离心 20 min，上清即为细胞核蛋白，转移到干净的 EP 管中保存。

三、注意事项：

- 1、PMSF 水溶液易失效，需在提取试剂加入样品前 2-3min 内完成添加，不要过早加入，确保抑制效果。
- 2、蛋白提取的所有操作步骤均需在冰上或 4°C低温环境下进行，避免蛋白降解。
- 3、推荐使用新鲜组织作为提取样品。
- 4、蛋白浓度检测不建议使用普通 Bradford 法，推荐采用 BCA 法，检测结果更准确。

